

10/533104

Rec'd 7/PTO 28 APR 2005

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP 03/13954

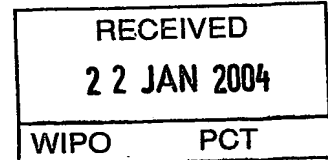
27.11.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2002年10月30日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2002-316639  
[ST. 10/C]: [JP 2002-316639]



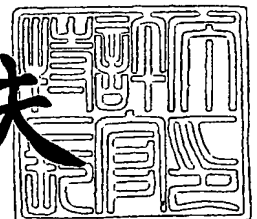
出 願 人  
Applicant(s): ユニバーシティ カレッジ ロンドン  
中外製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 1月 7日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特2003-3108923

【書類名】 特許願

【整理番号】 1024776

【提出日】 平成14年10月30日

【あて先】 特許庁長官 太田 信一郎 殿

【国際特許分類】 A61K 39/00

【発明の名称】 HM 1 . 2 4 を応用した癌ワクチン

【請求項の数】 12

【発明者】

【住所又は居所】 イギリス国, ダブリュシー 1 イー 6 ビーティー, ロンドン, ゴーワー ストリート ユニバーシティ カレッジ ロンドン アン インスティテュート インコーポレイテッド バイ ロイヤル チャーター

【氏名】 クエ ヨン

【発明者】

【住所又は居所】 徳島県徳島市八万町千鳥 1 1 - 1 0

【氏名】 小阪 昌明

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区京橋 2 - 1 - 9 中外製薬株式会社内

【氏名】 小石原 保夫

【特許出願人】

【識別番号】 597013168

【氏名又は名称】 ユニバーシティ カレッジ ロンドン

【特許出願人】

【識別番号】 000003311

【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

## 【代理人】

【識別番号】 100077517

【弁理士】

【氏名又は名称】 石田 敬

【電話番号】 03-5470-1900

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100092624

【弁理士】

【氏名又は名称】 鶴田 準一

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100087871

【弁理士】

【氏名又は名称】 福本 積

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100082898

【弁理士】

【氏名又は名称】 西山 雅也

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100081330

【弁理士】

【氏名又は名称】 樋口 外治

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 036135

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9814920

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 HM1.24を応用した癌ワクチン

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 HM1.24によりパルスされた抗原特異的樹状細胞を有効成分とする癌ワクチン。

【請求項 2】 前記HM1.24がHM1.24蛋白質又はHM1.24ペプチドである、請求項 1 に記載の癌ワクチン。

【請求項 3】 前記HM1.24ペプチドが可溶性HM1.24ペプチドである、請求項 2 に記載の癌ワクチン。

【請求項 4】 HM1.24をコードする遺伝子が導入された抗原特異的樹状細胞を有効成分とする癌ワクチン。

【請求項 5】 前記遺伝子がDNA又はRNAである、請求項 4 に記載の癌ワクチン。

【請求項 6】 前記DNAがcDNAである、請求項 5 に記載の癌ワクチン。

【請求項 7】 HM1.24蛋白質又はHM1.24ペプチドを有効成分とする癌ワクチン。

【請求項 8】 前記HM1.24ペプチドが可溶性HM1.24ペプチドである、請求項 7 に記載の癌ワクチン。

【請求項 9】 HM1.24をコードする遺伝子を有効成分とする癌ワクチン。

【請求項 10】 前記遺伝子がDNA又はRNAである、請求項 9 に記載の癌ワクチン。

【請求項 11】 前記DNAがcDNAである、請求項 10 に記載の癌ワクチン。

【請求項 12】 前記癌がHM1.24を発現する器官や組織の癌である、請求項 1～11のいずれか1項に記載の癌ワクチン。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、癌抗原HM1.24を応用した癌ワクチンに関し、特にHM1.24がパルスされた、あるいはHM1.24をコードする遺伝子が導入された樹状細胞を利用する癌ワ

クチンに関する。

#### 【0002】

##### 【従来の技術】

HM1.24は、骨髓腫特異的抗原として同定されたタイプII膜貫通糖蛋白質であり、多発性骨髓腫の免疫療法における標的分子として期待されているほか、細胞性免疫を利用した癌免疫療法における抗原としても期待される。保護的な抗腫瘍応答の発生のためには、適切な癌抗原の効果的な提示が必要である。樹状細胞は、最も効果的な抗原提示細胞の一種であり、生来のT細胞をプライムする事が出来、そしてCD4 T-ヘルパー細胞応答及びCD8 細胞傷害性T細胞応答を誘導する。このため、樹状細胞は癌免疫療法における抗原提示細胞としての利用が注目されている。しかしながら、樹状細胞をHM1.24抗原のための抗原提示細胞として使用し、T細胞を刺激して細胞傷害性T細胞を生成せしめ、癌細胞を障害するには至っていない。

#### 【0003】

##### 【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明はHM1.24抗原の抗原提示細胞として樹状細胞を利用して細胞傷害性T細胞を生成せしめることによる新規なタイプの癌ワクチンを提供しようとするものである。本発明はまた、HM1.24蛋白質又はペプチド自体を有効成分とする癌ワクチンを提供する。本発明は更に、HM1.24蛋白質又はペプチドをコードするDNA又はRNAを有効成分とする癌ワクチンを提供する。

#### 【0004】

##### 【課題を解決するための手段】

従って本発明は、HM1.24によりパルスされた、あるいはHM1.24をコードする遺伝子が導入された、抗原特異的樹状細胞を有効成分とする癌ワクチンを提供する。このHM1.24はHM1.24蛋白質又はHM1.24ペプチドであり、好ましくは可溶性HM1.24ペプチドである。

本発明はまた、HM1.24蛋白質又はHM1.24ペプチドを有効成分とする癌ワクチンを提供する。このHM1.24ペプチドは、好ましくは可溶性HM1.24ペプチドである。

本発明はまた、HM1.24をコードするDNA又はRNAを有効成分とする癌ワクチンを

提供する。このDNAは好ましくはcDNAである。

#### 【0005】

##### 【発明の実施の形態】

本発明は、HM1.24によりパルスされた、あるいはHM1.24をコードする遺伝子が導入された、抗原特異的樹状細胞を有効成分とする癌ワクチンに関する。

実験動物では、ペプチドの直接投与よりも、抗原ペプチドや遺伝子を導入した樹状細胞を投与する方が免疫効果が高い。樹状細胞に癌抗原を多量に発現させる方法として、ペプチドや蛋白質による *in vitro* 感作や抗原DNAやRNAの導入が行なわれる。抗原プロセスを必要とする蛋白質やRNAを取り込ませるためには、未熟樹状細胞が使用され、そしてペプチド感作には成熟樹状細胞や、CD40Lなどにより活性化した樹状細胞が使用される。

#### 【0006】

RNA又はDNAは低率で樹状細胞に導入できるが、十分に導入するためにはウイルスベクターを使用する必要がある。CD34+細胞にウイルスベクターを用いて癌抗原を導入し、GM-SF又はTNF- $\alpha$ と共に培養することにより、癌抗原発現樹状細胞に分化させる方法も使用可能である。

#### 【0007】

樹状細胞は、一般に、免疫応答の開始時に補助細胞として働く樹状突起を持った細胞群であり、骨髓由来でマクロファージと近縁の細胞であるが貪食能はなく、多くの臓器の間質に広く分布しており、特にリンパ節や脾臓のT細胞領域に広く分布しており、ヘルパーT細胞への抗原提示細胞として働く。樹状細胞は、本発明においては、HM1.24蛋白質又はペプチドによりパルスされた場合、T細胞から細胞傷害性T細胞への分化に関与すると考えられる。また、HM1.24をコードする遺伝子を樹状細胞に導入した場合にも同様の効果が得られる。

#### 【0008】

本発明の癌ワクチンの製造に使用する樹状細胞は末梢血から比重遠心法により直接分離し、あるいは前駆細胞からサイトカインなどで誘導する。比重遠心法による直接分離においては、末梢血をアフエレーシスし、それから樹状細胞を比重遠心法により分離、調製する。この方法においては、サイトカインを必要とせず

、腫瘍時間も短い。この場合、成熟樹状細胞が得られ、成熟度の調整は出来ない。サイトカインで誘導する場合、前駆細胞としては、末梢血単核球付着細胞分画、末梢血単球であるCD14<sup>+</sup>細胞、骨髓又は末梢血中の造血前駆細胞であるCD34<sup>+</sup>細胞が用いられる。

#### 【0009】

本発明において、HM1.24を樹状細胞に「パルスする」とは、HM1.24蛋白質又はペプチドを単独で、又はリポゾムなどの医薬として許容されるキャリアーと共に、樹状細胞と所定の時間に亘って所定の条件下で接触せしめる事を意味し、例えば、接触時間は数分間～数日間であり、接触条件及び接触方法は、例えば、Chiriva-Internati, M. et.al. Blood (2002) 100, p.961-965 (蛋白質)、Thuner, B. et.al., J. Exp. Med. (1999) 190, p.1669-1678 (ペプチド) に記載の方法の通りに行なうことが出来る。

#### 【0010】

本発明において、HM1.24をコードする遺伝子を樹状細胞に導入する方法は、DNA (好ましくはcDNA) 又はRNAを直接又は適当なベクター、好ましくは哺乳類、特にヒトにおいて機能する発現ベクターに挿入することにより導入することができる。例えば、Chiriva-Internati, M. et.al., Blood (2002), 100, p.961-965に記載の方法により行うことが出来る。

#### 【0011】

HM1.24によりパルスされた、あるいはHM1.24をコードする遺伝子を導入した、抗原特異的樹状細胞を有効成分とする癌ワクチンは、例えば、患者から樹状細胞を集め、この樹状細胞をHM1.24蛋白質またはペプチドにより上記のようにしてパルスし、あるいはHM1.24をコードする遺伝子を上記のようにして導入し、この細胞を前記患者に、又は異なる患者に導入することにより投与することが出来る。

#### 【0012】

本発明は更に、HM1.24蛋白質又はペプチドを有効成分とする癌ワクチンに関する。HM1.24蛋白質又はHM1.24ペプチドを免疫原として使用する場合には、CD8<sup>+</sup>T細胞抗原の他にCD4<sup>+</sup>T細胞認識抗原の使用が好ましく、このような抗原 (ヘルパーエピトープ) として、KLHやテタヌストキソイドの如き免疫原性が強い外来抗原

が使用され、あるいは癌抗原自体のヘルパーエпитープが使用される。

抗原蛋白質 (HM1.24蛋白質) をコレステロール・多糖複合体やビーズなどの顆粒状にして投与することにより、樹状細胞などに取り込まれ、MHCクラス I 抗原提示経路に効率よくペプチドを乗せてCD8+T細胞を誘導することが出来る。強いアジュバント作用をもつ細菌由来の熱ショック蛋白質との融合蛋白質として用いることにより、CD8+T細胞を強く誘導することができよう。

#### 【0013】

このワクチンは、有効成分としてのHM1.24蛋白質又はペプチドの外に、医薬として許容されるキャリアー、例えばアジュバント、例えば水酸化アルミニウムの如き鉱物ゲル；リソレシチン、プルロニックポリオールの如き界面活性剤；ポリアニオン；ペプチド；又は油乳濁液を含むことが出来る。あるいは、リポゾーム中へ混入し、又は多糖、及び／又はワクチン中に配合される他の集合体を含むことが出来る。

#### 【0014】

本発明は更に、HM1.24蛋白質又はペプチドをコードする遺伝子を有効成分とする、癌ワクチンに関する。癌抗原遺伝子を含む組換えウイルスは、抗原の細胞内多量発現により、マウスでは強い抗腫瘍免疫を誘導できる。多数のCTL及びヘルパーエпитープを同時発現させることも出来、HLAタイプに拘わらず多くの患者に使用可能である。しかし、強い抗ウイルス免疫応答のため、反復投与が出来ないので、癌のように頻回の免疫が必要な場合、多数の異なるウイルスベクターを準備するのが好ましい。脂肪内寄生性細菌はMHCクラス I とクラスIIの両方に抗原を乗せることが出来、ワクチン用ベクターとして有用である。

#### 【0015】

DNAの直接投与は、DNA免疫法として、動物では予防接種の一方法として効果が認められている。プラスミドのような細菌由来DNAの非メチル化CpG配列には、IL-12産生などを介して腫瘍拒絶に重要なTh1活性化を行なうアジュバント作用がある。抗原遺伝子を含むプラスミドを筋注や遺伝子銃(gene gun)を用いて免疫する方法は、1回の免疫効果は弱い反復投与が可能であり、他の免疫法との併用が考えられる。免疫効率を上げるには、エпитープにリーダー配列を結合させたり

、エピトープをHLA分子に直接結合させた融合遺伝子を用いることが出来る。

遺伝子は好ましくはDNA又はRNAであり、DNAは好ましくはcDNAであり、適当なベクター、好ましくは、哺乳類、特にヒトにおいて機能する発現ベクターに挿入した後動物に投与することにより、癌免疫を生じさせることが出来る。

#### 【0016】

本発明の癌ワクチンは、HM1.24を発現する器官や組織の癌に対して特に有効であり、造血器腫瘍または固形癌に有効である。造血器腫瘍としては、例えば白血病、リンパ腫、骨髄腫などに有効であり、前記白血病としては、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病などが挙げられ、前記リンパ腫としては、ホジキン病、T細胞性非ホジキンリンパ腫、B細胞性非ホジキンリンパ腫などが挙げられ、そして前記骨髄腫としては多発性骨髄腫が挙げられる。

#### 【0017】

固形癌としては、具体的には、頭頸部癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、食道癌、乳癌、胃癌、結腸癌、直腸癌、肺臓癌、胆道癌、膵臓癌、卵巣癌、子宮頸癌、子宮体癌、前立腺癌、腎臓癌、膀胱癌、皮膚癌、脳腫瘍、小児固形癌、悪性骨腫瘍などが挙げられる。また、これら固形癌の転移ならびに転移巣、固形癌に伴うがん性胸膜炎、がん性腹膜炎、がん性髄膜炎なども挙げられる。

#### 【0018】

本発明で使用するHM1.24はHM1.24蛋白質または好ましくは可溶性のHM1.24蛋白質又はペプチドである。本発明の可溶性HM1.24抗原蛋白質としては、配列番号：5示すアミノ酸配列においてアミノ酸位置1位のAsnからアミノ酸位置132位のGlnからなるアミノ酸配列を有し、且つ可溶性HM1.24抗原蛋白質の生物学的活性を有するタンパク質であれば、いかなるものであってもよい。可溶性HM1.24抗原蛋白質の生物学的活性とは、抗HM1.24抗体に特異的に結合され、細胞膜には結合しておらず細胞膜から遊離して可溶性であり、且つ二量体である。

#### 【0019】

また、本発明の可溶性HM1.24抗原蛋白質は、可溶性HM1.24抗原蛋白質の生物学的活性を有し、且つ配列番号：5に示すアミノ酸配列に対する1又は複数個のア

ミノ酸残基の置換、欠失及び／又は付加により修飾されたアミノ酸配列を有する可溶性HM1.24抗原蛋白質であってよい。本発明の可溶性HM1.24抗原蛋白質は、より具体的には可溶性HM1.24抗原蛋白質の生物学的活性を有する限り、配列番号：5に示すアミノ酸配列において、1又は2個以上、好ましくは1又は24個以下、より好ましくは1又は12個以下のアミノ酸残基が置換したアミノ酸を有してよい。

#### 【0020】

又は、配列番号：5に示すアミノ酸配列において、1又は2個以上、好ましくは1又は42個以下、より好ましくは1又は17個以下のアミノ酸残基が欠失したアミノ酸を有してよい。又は、配列番号：5に示すアミノ酸配列において、1又は2個以上、好ましくは1又は50個以下、より好ましくは1又は14個以下のアミノ酸残基が付加したアミノ酸を有してよい。本発明に使用される可溶性HM1.24抗原タンパク質はまた、上記アミノ酸の置換、欠失及び／又は付加による修飾が同時になされていてもよい。

#### 【0021】

可溶性HM1.24抗原蛋白質は、配列番号：5において1位のアミノ酸Asnから90位のアミノ酸Argまでのアミノ酸配列を有していればその生物学的活性を示すことが明らかになっている。したがって、本発明の可溶性HM1.24抗原蛋白質は、配列番号：5において1位のアミノ酸Asnから90位のアミノ酸Argまでのアミノ酸配列を有するか、あるいは1位のアミノ酸Asnから90位のアミノ酸Argまでのアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の置換、欠失及び／又は付加により修飾されたアミノ酸配列を有する可溶性HM1.24抗原蛋白質であってよい。

#### 【0022】

可溶性HM1.24抗原蛋白質は、その生物学的活性有する限り、配列番号：5において90位のアミノ酸Argから132位のアミノ酸Glnまでのアミノ酸配列を有するか、あるいはこのアミノ酸配列に対して1又は複数個のアミノ酸残基の置換、欠失及び／又は付加により修飾されたアミノ酸配列を有する可溶性HM1.24抗原蛋白質であってよい。

配列番号：5に示すアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の置換

、欠失及び／又は付加により修飾されたアミノ酸配列を有する可溶性HM1.24抗原蛋白質として、配列番号：7又は17、10又は18、あるいは11又は19に示されるアミノ酸配列を有する可溶性HM1.24抗原蛋白質が挙げられる。

#### 【0023】

あるアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の置換、欠失及び／又は付加により修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質質がその生物学的活性を維持することはすでに知られている (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433、Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413)。

#### 【0024】

本発明の可溶性HM1.24抗原蛋白質は、由来する種、それらを産生する宿主及び／又は精製方法により、アミノ酸配列、分子量、等電点、糖鎖付加の有無や糖鎖付加の位置、糖鎖の構造、リン酸化状態及び／又はジスルフィド結合の有無が異なる。しかしながら、本発明に好適に使用し得る限り、いかなる構造を有する蛋白質であってよい。タンパク質が由来する種としてはヒトが好ましい。

#### 【0025】

本発明の可溶性HM1.24抗原蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：5に示す塩基配列の塩基位置1位の塩基アデニンから396位の塩基グアニンからなる塩基配列が挙げられる。また、本発明の可溶性HM1.24抗原蛋白質をコードするDNAとしては配列番号：5に示す塩基配列を有するDNAであれば、いかなる由来のDNAであってよい。このようなDNAとして、例えばジェノミックDNA、cDNA、合成DNAが挙げられる。これらは、種々の細胞、組織又は臓器あるいはヒト以外の種から得られたcDNAライブラリー、ジェノミックライブラリーから得られたDNAであってよいし、それらは市販のDNAライブラリーであってもよい。これらライブラリーに用いられるベクターとしては、プラスミド、バクテリオファージ、YACベクター等いかなるものであってもよい。

#### 【0026】

本発明の可溶性HM1.24抗原蛋白質をコードするDNA としてはまた、配列番号：5に示す塩基配列に対しハイブリダイズし、且つ可溶性HM1.24抗原蛋白質の生物学的活性を有するポリペプチドをコードするDNA であってもよい。可溶性HM1.24抗原蛋白質をコードするDNA がハイブリダイズする条件としては、適度なストリンジエンシー条件下においてハイブリダイズするDNA が挙げられる。

#### 【0027】

このようなハイブリダイズ条件としては、例えば低ストリンジエンシーな条件が挙げられる。低ストリンジエンシーな条件としては、例えば42℃、5×SSC、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム、50% ホルムアミドにより与えられる洗浄条件である。より好ましくは、高ストリンジエンシーな条件が挙げられる。高ストリンジエンシーな条件としては、例えば60℃、0.1×SSC、0.1%ドデシル硫酸ナトリウムにより与えられる洗浄条件である。ある蛋白質をコードする塩基配列に対し、適度な条件でハイブリダイズするDNA がコードする蛋白質がその蛋白質と同じ生物学的活性を有することはすでに知られている。

#### 【0028】

従って、本発明の可溶性HM1.24抗原蛋白質は、上記の「ハイブリダイズするDNA」によりコードされており、可溶性HM1.24抗原蛋白質の生物活性を有する蛋白質も包含する。

なお、細胞膜上に発現するヒトHM1.24抗原蛋白質のアミノ酸配列を配列番号：15又は23に示す。配列番号：15又は23のアミノ酸配列を有するヒト蛋白質をコードするDNA をpUC ベクターのXbaI切断部位間に保持するプラスミドpRS38-pUC19を含有する大腸菌はEscherichia coli DH5 $\alpha$  (pRS38-pUC19) と命名され、平成5 (1993) 年10月5日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託番号FERM BP-4434として、ブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

#### 【0029】

本発明の可溶性HM1.24抗原蛋白質はまた、可溶性HM1.24抗原蛋白質の生物学的活性を有する限り他のペプチド又はポリペプチドと融合した上記蛋白質であってもよい。これら融合蛋白質を作製する方法は、すでに公知の手法を用いることがで

きる。蛋白質との融合に付される他のペプチド又はポリペプチドとしては、本発明に有効に使用される限りいかなるペプチド又はポリペプチドであってよい。

#### 【0030】

例えば、ペプチドとしては、FLAG (Hopp, T. P. et al., BioTechnology (1988) 6, 1204-1210)、6 個のHis (ヒスチジン) 残基からなる6×His、10×His、インフルエンザ凝集素 (HA)、ヒトc-myc の断片、VSV-GPの断片、p18HIVの断片、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV40T 抗原の断片、lck tag、 $\alpha$ -tubulin の断片、B-tag、Protein C の断片等、すでに公知であるペプチドが使用される。

また例えば、ポリペプチドとしては、GST (グルタチオン・S・トランスフェラーゼ)、HA、イムノグロブリン定常領域、b-ガラクトシダーゼ、MBP (マルトース結合蛋白質) 等が挙げられる。これらは市販されているものを用いることができる。

#### 【0031】

本発明の蛋白タンパク質をコードするDNA は、以上に述べたDNA を市販のキットや公知の方法によって構築することができる。例えば、制限酵素による消化、リンカーの付加、開始コドン (ATG) 及び／又は終始コドン (ATT、TGA 又はTAG) の挿入等により構築することができる。

#### 【0032】

本発明の蛋白質の発現ベクターは、本発明に好適に使用される発現ベクターであればいかなる発現ベクターであってよい。発現ベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター、例えばpEF、pCDM8、昆虫細胞由来の発現ベクター、例えばpBacPAK8、植物由来の発現ベクター、例えばpMH1、pMH2、動物ウイルス由来の発現ベクター、例えばpHSV、pMV、酵母由来の発現ベクター、例えばpNV11、枯草菌由来の発現ベクター、例えばpPL608、pKTH50、大腸菌由来の発現ベクター、例えばpGEX、pGEMEX、pMALp2が挙げられる。

#### 【0033】

本発明の蛋白質の発現ベクターには、例えば可溶性HM1.24抗原蛋白質をコードするDNA をプロモーターの下流に連結し、これを発現ベクターに導入することにより製造することができる。プロモーター／エンハンサーとしては、哺乳動物由

来のプロモーター／エンハンサー、例えばEF1- $\alpha$  プロモーター／エンハンサー、 $\gamma$ -アクチンプロモーター／エンハンサー、昆虫ウイルス由来のプロモーター／エンハンサー、例えば多核体（ポリヘドリン）ウイルスプロモーター／エンハンサー、植物由来のプロモーター／エンハンサー、例えばタバコモザイクウイルスプロモーター／エンハンサー、動物ウイルス由来のプロモーター／エンハンサー、例えばSV40プロモーター／エンハンサー、ヒトCMV プロモーター／エンハンサー、酵母由来のプロモーター／エンハンサー、例えばアルコール脱水素酵素プロモーター／エンハンサー、大腸菌由来のプロモーター／エンハンサー、例えばLac プロモーター／エンハンサー、Trp プロモーター／エンハンサー、Tac プロモーター／エンハンサーが挙げられる。

#### 【0034】

本発明蛋白質の発現には、発現に用いられる宿主に適したシグナル配列を付加して使用してもよい。シグナル配列としては、例えば分泌蛋白質のシグナル配列が挙げられる。分泌蛋白質のシグナル配列としては、例えば哺乳動物由来分泌蛋白質のシグナル配列、例えばイムノグロブリンのシグナル配列が挙げられる。また分泌蛋白質のシグナル配列としては、大腸菌由来分泌蛋白質のシグナル配列、例えばOmpA等のペリプラズム分泌シグナル配列が挙げられる。

このように作製した発現ベクターは、公知の方法により宿主に導入することができる。宿主への導入の方法としては、例えばエレクトロポレーション、リン酸カルシウム法、リポソーム法が挙げられる。

#### 【0035】

本発明に使用される蛋白質は、上述のように遺伝子組換え技術を用いて產生させた組換え蛋白質として得ることができる。例えば、組換え蛋白質は、本明細書に記載された遺伝子の塩基配列をそれらを発現する細胞、組織、又は臓器からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し產生させる。本発明には、この組換え蛋白質を用いることができる。

#### 【0036】

具体的には、本発明に使用される蛋白質を発現する細胞、組織、又は臓器から、その遺伝子をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば

、グアニジン超遠心法(Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、AGPC法(Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159)等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia)等を使用して全RNAからmRNAを精製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia)を用いることによりmRNAを直接調製することもできる。

#### 【0037】

得られたmRNAから逆転写酵素を用いて遺伝子のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業)等を用いて行うこともできる。また、cDNAの合成及び増幅を行うにはMarathon cDNA Amplification kit (CLONTECH製)及びポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction; PCR)を用いた5'-RACE法(Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932)を使用することができる。

#### 【0038】

得られたPCR産物から目的とするDNA断片を調製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法により確認する。目的とするDNAが得られれば、これを発現ベクターへ組み込む。より具体的には、前記のように構築したDNAは、下記のように発現させ、タンパク質を得ることができる。

#### 【0039】

哺乳類細胞を使用する場合、常用される有用なプロモーター／エンハンサー、発現される遺伝子、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させたDNAあるいはそれを含むベクターにより発現させることができる。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウイルス前期プロモーター／エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer)を挙げることができる。

#### 【0040】

また、その他に蛋白質発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、シミアンウイルス40 (SV 40) 等のウイルスプロモーター／エンハンサーやヒトエロンゲーションファクター-1  $\alpha$  (HEF1 $\alpha$ ) の哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサーを用いればよい。

例えば、SV 40 プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mulliganらの方法 (Nature (1979) 277, 108)、また、HEF1 $\alpha$  プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mizushima らの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) に従えば容易に実施することができる。

#### 【0041】

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、蛋白質分泌のためのシグナル配列、発現させる遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合、Wardらの方法 (Nature (1998) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーターを使用する場合、Betterらの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) に従えばよい。

蛋白質分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。

#### 【0042】

複製起源としては、SV 40、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス (BPV) 等の由来のものを用いることができる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

本発明において、蛋白質の製造のために、任意の産生系を使用することができる。蛋白質製造のための産生系は、in vitro及びin vivo の産生系がある。in vitroの産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系

が挙げられる。

#### 【0043】

真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いる産生系がある。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えばCHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945)、COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、(2) 両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340)、あるいは(3) 昆虫細胞、例えばsf9、sf21、Tn5 が知られている。CHO 細胞としては、特にDHFR遺伝子を欠損したCHO 細胞であるdhfr-C<sub>H</sub>O (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) やCHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) を好適に使用することができる。

#### 【0044】

植物細胞としては、ニコチアナ・タバクム (*Nicotiana tabacum*) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えばサッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌、例えばアスペルギウス属 (*Aspergillus*) 属、例えばアスペルギウス・ニガー (*Aspergillus niger*) が知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、枯草菌が知られている。

#### 【0045】

これらの細胞を目的とするDNAにより形質転換し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより蛋白質が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時のpHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30～40℃で約15～200時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。

#### 【0046】

一方、*in vivo* の産生系としては、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物又は植物に目的とするDNAを導入し、動物又は

植物の体内で蛋白質を産生させ、回収する。

動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。

哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

#### 【0047】

例えば、目的とするDNA をヤギ $\beta$ カゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。このDNA が挿入された融合遺伝子を含むDNA 断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から蛋白質を得る。トランスジェニックヤギから産生される蛋白質を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい。(Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

#### 【0048】

また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的とするDNA を挿入したバキュロウィルスのカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の蛋白質を得る (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。

さらに植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的とするDNA を植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えばニコチアナ・タバクム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より所望のタンパク質を得る (Julian, K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

#### 【0049】

なお、宿主への発現ベクターの導入方法としては、公知の方法、例えばリン酸カルシウム法 (Virology (1973) 52, 456-467) やエレクトロポレーション法 (

EMBO J. (1982) 1, 841-845 ) 等が用いられる。また、発現に使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現効率の高い配列を設計することができる (Grantham, R. et al., Nucleic Acids Research (1981) 9, r43-r74 ) 。

#### 【0050】

これらの動物又は植物に上記のように遺伝子を導入し、動物又は植物の体内で蛋白質を産生させ、回収する。前記のように発現、産生された蛋白質は、細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用する蛋白質の分離、精製は通常のタンパク質で使われている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。

#### 【0051】

例えば、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、蛋白質を分離、精製することができる (新生化学実験講座1 (1990) 東京化学同人) 。

#### 【0052】

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization : A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996) 。これらのクロマトグラフィーはHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

#### 【0053】

##### 【実施例】

次に、実施例により本発明を具体的に説明する。

##### 実施例 1. HM1.24をパルスした樹状細胞によるT細胞の刺激の有効性

末梢血単球 $3 \times 10^8$ 個を含むロイコアフェレシス (Leucoapheresis) 画分を10%FCSを含有するRPMI培地中で2時間培養して付着せしめ、非付着細胞を除去し、10%自己血清、GM-CSF及びIL-4を含むX-vivo20培地により培地交換し、これにより

樹状細胞を生成せしめ、その一部をT細胞の調製のために凍結した。こうして調製した樹状細胞にHM1.24ペプチドを加えてパルスし、次に成熟剤であるCD40-リガンド300ng/mLと共にインキュベートして成熟させた。次に、樹状細胞を採取し、HBSS中で洗浄し、そして、5%自己血清を含有するX-vivo培地中に $3 \times 10^6$ /mLの濃度で再懸濁した。これを、25Gyで照射した。

#### 【0054】

他方、前記の凍結した細胞を解凍し、洗浄し、細胞をカウントし、そしてIL-7 (10ng/mL及びIL-12 (10pg/mL) を含有する培地中に、 $3 \times 10^6$ /mLの濃度で再懸濁し、ウェルあたり1 mLをいれた。更に、培地の半分を交換することによりIL-7を再供給した。T細胞を採取し、カウントし、新たな培地に $3 \times 10^6$ /mLの濃度に再懸濁し、新たなサイトカインを含む新たな24ウェルプレートに入れた。

次に、このT細胞懸濁液に、前に調製した樹状細胞 (HM1.24でパルスし、照射したもの) を加え、1週間の間隔で2回、T細胞を刺激した。この培養の最後の5日間にインターロイキン-2 (IL-2)を添加した。

#### 【0055】

培養の最後にT細胞を採取し、そしてHM1.24を発現する刺激細胞 (stimulator cells) (HM1.24が負荷され、そして照射された末梢血単核球(PBMC))に応答するT細胞の能力について、ELISpotアッセイにより試験した。このELISpotアッセイにおいては、サイトカイン (IFN- $\gamma$ ) を分泌するT細胞 (抗原特異的T細胞) の数を、ELISA法により測定した。上記のHM1.24が負荷されたPBMCにより処理したT細胞の他に、陰性対照として、負荷されていない末梢血単核細胞により処理したT細胞及びサイトメガロウイルス (CMV) 抗原が負荷された末梢血単核細胞により処理したT細胞を用い、更に陽性対照として、自己の腫瘍細胞で処理したT細胞を用いた。

#### 【0056】

結果を、次の表1に示す。

【表1】

表1

刺激細胞 (標的)	IFN- $\gamma$ 分泌ユニット数/ $10^5$ T細胞 (平均 $\pm$ SE、n=3)
無し	86 $\pm$ 11
未負荷PBMC	106 $\pm$ 6
HM1.24負荷 PBMC	2341 $\pm$ 523
CMV負荷 PBMC	442 $\pm$ 95
自己の腫瘍細胞	1836 $\pm$ 111

## 【0057】

上の表から明らかな通り、HM1.24が負荷された標的によりチャレンジせられた場合、前記のT細胞は高レベルのサイトカイン(IFN- $\gamma$ )を産生し、このレベルは陰性対照に対するサイトカイン産生応答に比べて有意に高かった。対照抗原CMVの存在下でのサイトカインの産生は非常に低く、上記のT細胞はHM1.24に対して特異的であることが示された。重要なことには、上記のT細胞は、HM1.24を発現する自己の腫瘍細胞に強い反応を示した。表1に示した結果を、新鮮に単離された(生来の)T細胞(実施例1の第一パラグラフに記載した処理が施されていないT細胞)を用いて上記と同様な処理により得た結果と比較して図1に示す。

## 【0058】

実施例2. HM1.24をパルスした樹状細胞により刺激されたT細胞の細胞傷害性

HM1.24を発現する自己の腫瘍細胞(HM1.24が負荷されたPBMC)(標的細胞)を殺す、HM1.24をパルスした樹状細胞で刺激されたT細胞(実施例1に記載の方法により調製したもの)(エフェクターと称する)(細胞傷害性Tリンパ球)の能力を試験した。前記エフェクターT細胞を種々の濃度の標的細胞と共にインキュベートし、そして4時間後に、細胞傷害性(細胞死)の指標として乳酸脱水素酵素(LDH)の放出を測定した。図2に示す通り、エフェクター細胞(細胞傷害性Tリンパ球)と標的細胞とを20:1の比率でインキュベートした場合、エフェクター細胞

は標的細胞を殺した。これに対して、前記エフェクター細胞は陰性標的細胞 (HM 1.24が負荷されていないPBMC) を殺さなかった。

#### 【0059】

##### 参考例 1. 可溶性ヒトHM1.24抗原用発現プラスミドの構築

EcoRI (宝酒造社製) およびNotI (宝酒造社製) で消化することにより調製したEF1  $\alpha$  プロモーターを含むHEF 発現ベクター (国際特許出願公開番号W092-19759) と、Igリーダー配列とHAタグをコードする遺伝子ペア (Amersham Pharmacia 社製) を、50 mmol/L Tris-HCl、pH7.6、10 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mmol/L ジチオスレイトール、1 mmol/L ATP、50 mg/mLのポリエチレングリコールおよび10ユニット T4 DNAリガーゼ (TOYOBO社製) を含有する反応混合物中で、16℃にて3時間反応させ連結した。

#### 【0060】

挿入したIgリーダー配列とHAタグをコードする遺伝子として、EcoRI、KpnI (宝酒造社製) およびNotI制限酵素認識部位をリンカーとして接続した配列番号1及び2に示す合成遺伝子ペアを用いた。次に連結反応混合物を大腸菌 DH5  $\alpha$  のコンピテント細胞 (GIBCO-BRL 社製) に加え、これを氷上で30分間、42℃にて1分間、そして再び氷上で1分間静置した。

#### 【0061】

次いで、400  $\mu$ L のSOC 培地 (Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Sambrook ら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)) を加え、37℃にて1時間インキュベーションした後、50  $\mu$ g/mLのアンピシリンを含有するLB寒天培地 (Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Sambrook ら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)) 上にこの大腸菌を播き、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。

#### 【0062】

この大腸菌形質転換体を 50  $\mu$ g/mLのアンピシリンを含有するLB培地中で37℃にて一夜培養し、この培養物から、アルカリ法 (Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Sambrook ら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)) に従ってプラスミドDNA を調製した。

## 【0063】

一方、HM1.24抗原の細胞外領域の遺伝子はThermal Cycler (Perkin Elmer Cetus社製) を用いたPCR 法により増幅した。HM1.24抗原のcDNA (配列番号15) を鋳型として、100 pmolの配列番号3及び4に示したプライマー、10 mmol/L Tris-HCl、pH8.3、50 mmol/L KCl、0.1 mmol/L dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>および5ユニットのDNA ポリメラーゼAmpli Taq (Perkin Elmer Cetus社製) を含有する混合物を最初に94℃にて最初の変性の後、94℃にて1分間、55℃にて1分間、72℃にて1分間のサイクルを30回行い、最後に72℃にて10分間インキュベーションした。

## 【0064】

このPCR 産物をHM1.24抗原の細胞外領域 (配列番号5) の遺伝子として、KpnI およびBamHI 消化した上記プラスミドDNA と50 mmol/L Tris-HCl、pH7.6、10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、10 mM ジチオスレイトール、1 mmol/L ATP、50 mg/mLのポリエチレングリコールおよび1ユニットT4 DNAリガーゼ (TOYOBO社製) を含有する反応混合物中で、16℃にて3時間反応させ連結した。上記同様に、連結反応混合物を大腸菌 DH5  $\alpha$  のコンピテント細胞に加え、大腸菌形質転換体を得、これよりプラスミドDNA を調製した。このプラスミドDNA をHAタグ付加可溶性抗原発現プラスミド、psHMとした。

## 【0065】

また、配列番号3及び6に示したプライマーを用い、同様にしてC端も削除したHM1.24抗原の細胞外領域 (配列番号7) を発現するプラスミド、psHM164 を作製した。

## 【0066】

## 塩基配列決定

psHM及びpsHM164 の塩基配列決定は自動DNA シークエンサー (Applied Biosystem Inc. 社製) およびTaq Dye terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystem Inc. 社製) を用いて、メーカー指定のプロトコールに従って行った。配列番号8及び9に示したプライマー (サワディーテクノロジー社製) を用いた。その結果、可溶性抗原にHAタグペプチドをつないだ融合タンパク (配列番号10及

び11)が発現する構造になっていることを確認した。

#### 【0067】

##### 参考例 2. 可溶性ヒトHM1.24抗原高発現細胞の樹立

###### (1) CHO 細胞へのトランスフェクション

HAタグ付加可溶性HM1.24抗原安定産生系を樹立するために、PvuI (GIBCO-BRL 社製) で消化して得た直鎖状にした前記発現ベクター (psHM及びpsHM164) をエレクトロポレーション法によりCHO 細胞DXB11 株 (Medical Research Council collaboration Center より供与) に遺伝子導入した。ベクター  $1 \mu\text{g}$  をPBS (-) 中  $1.1 \times 10^7$  細胞/mL の 0.8 mL アリコートに加え、Gene Pulser 装置 (Bio-Rad 社製) を用いて1.5 kV、25  $\mu\text{F}$  の容量にてパルスを与えた。

#### 【0068】

室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーションされた細胞を、100 mLの10% FCS (GIBCO-BRL社製)、1% ペニシリンーストレプトマイシン (GIBCO-BRL 社製) 含有  $\alpha$ -MEM (ヌクレオシド不含有) 選択培地 (GIBCO-BRL 社製) に懸濁し、100  $\mu\text{L}$ /ウェル ( $1 \times 10^4$  細胞/ウェル) で平底96穴プレート (FALCON社製) に播種した。37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターにて一晚培養した後、選択培地を更に100  $\mu\text{L}$ /ウェル加え、セレクションを行った。14日目にサンドイッチELISA (細胞株の選択の項参照) によるアッセイを行い、HA-sHM又はHA-sHM164 を高発現する24クローンを選択し、24ウェルプレートにて拡大培養 (1 mL/ウェル) した。これら核酸不含培地で選択したクローンは安定増殖を確認した後、更にアッセイを行い、それぞれ10クローンずつに絞った。

#### 【0069】

###### (2) 細胞株の選択

後記の可溶性ヒトHM1.24のELISA は次のようにして行った。高産生の株を選択するために可溶性抗原の産生量を抗HA抗体 (Boehringer Mannheim 社製) とヒト型化抗HM1.24抗体 (小野浩一郎ら 第20回日本分子生物学会年会 一般演題 3-5 01-P-478) によるサンドイッチELISA で比較し、細胞株の選択を行った。精製抗原を得ていないため抗原濃度は分からないので、濃度の比較はELISA を行った際の細胞数を考慮した。

## 【0070】

尚、本実施例では、再構成ヒト抗HM1.24抗体（ヒト型化抗HM1.24抗体）として W098/14580に記載の軽鎖バージョン a と重鎖バージョン s を用いた。軽鎖バージョン a を含むプラスミドを有する大腸菌は、Escherichia coli DH5  $\alpha$  (pUC19-RVLa-AHM-gK) として、工業技術院生命工学工業技術研究所に、平成 8 年（1997 年）8 月 29 日に、FERM BP-5645 としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。また、ヒト型化抗HM1.24抗体の重鎖バージョン s を含むプラスミドを有する大腸菌は、Escherichia coli DH5  $\alpha$  (pUC19-RVHs-AHM-g $\gamma$  1) として、工業技術院生命工学工業技術研究所に、平成 9 年（1997 年）9 月 29 日に、FERM BP-6127 としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

## 【0071】

抗HA抗体（Boehringer Mannheim 社製）をCoating Buffer（C.B.: 0.1 mol/L 重炭酸ナトリウム緩衝液、pH 9.6、0.02% ナトリウムアジド）にて 1  $\mu$ g/mL に調製したものを、100  $\mu$ L/well で平底96穴プレート（Nunc社製）に添加し、4  $^{\circ}$ C で一晚コーティングした。

## 【0072】

プレート洗浄器を用いて、300  $\mu$ L/ウェルの0.05% Tween 20を含むPBS（-）にて3回洗浄した抗HA抗体コーティングプレートに200  $\mu$ L/ウェルで希釈緩衝液（50 mmol/L Tris-HCl、pH 8.1、1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.15 mol/L NaCl、0.05% Tween 20、0.02% ナトリウムアジド、1% BSA）を加え、室温で2時間ブロッキングを行った。希釈緩衝液を捨てた後、CHO 細胞による培養上清をそのまま又は適宜希釈緩衝液で希釈したものを100  $\mu$ L/ウェル加え、室温で2時間反応させた。

## 【0073】

陽性対照としてCGM/sHM（尾寄恭子ら 60回日本血液学会 一般演題 690）を用いた。次に、同様に洗浄したプレートにヒト型化抗HM1.24抗体（小野浩一郎ら 第20回日本分子生物学会年会 一般演題 3-501-P-478）を1  $\mu$ g/mL に希釈緩衝液で調製したものを100  $\mu$ L/ウェル加えて室温で1時間反応させた。同様に洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識ヒツジ抗ヒトIgG 抗体（BIOSOURCE 社製）を希釈緩衝液で5000倍希釈したものを100  $\mu$ L/ウェルずつ加え、室温で1時間反応

させた。

#### 【0074】

最後に、5回洗浄し、SIGMA104 (p-ニトロフェニルホスフェート二ナトリウム塩六水和物: SIGMA 社製) を基質緩衝液 (S.B.: 0.05 mol/L 重炭酸ナトリウム緩衝液、pH 9.8、10 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ ) で 1 mg/mL にしたものを 100  $\mu\text{L}$ /ウェルずつ加えて発色させ、MICROPLATE READER (BIO-RAD社製) で 405 nm-655 nm の吸光度を測定した。

#### 【0075】

##### A. 10nmol/L MTXによる遺伝子増幅

それぞれHAタグを付加した、HM1.24抗原の膜貫通領域を欠損した可溶性HM1.24抗原 (sHM) 及びsHM のC末端を欠損したsHM164の発現ベクターを導入したDXB11細胞で、各10株ずつ (sHM 産生株: 1-1, 8-2, 9-3, 11-4, 14-5, -16, -17, -22, -23, -24, sHM164産生株: 164-1, -2, -3, -5, -6, -7, -8, -10, -13, -16) について、25  $\text{cm}^2$  フラスコにて 10 nmol/L メトトレキサート (Methotrexate) (MTX) 含有培地 ( $\alpha$ -MEM (GIBCO-BRL 社製)、10% FCS (GIBCO-BRL社製、1% ペニシリン-ストレプトマイシン (GIBCO-BRL 社製)、100 nmol/L MTX (SIGMA 社製)) で培養した。

#### 【0076】

8日後、培養上清 (3日培養) 中の抗原産生量をELISA で測定した。発現量が高く、かつ細胞が十分に増えていたsHM 産生株である11-4並びにsHM164産生株である164-2 及び164-13について100 nmol/L MTXによる遺伝子増幅を行った (後基B. 項参照)。残りの株は十分に10 nmol/L MTX に適応していなかったため、さらに10 nmol/L MTX 培地で培養を続けた。

#### 【0077】

11日後、培養上清 (3日培養) 中の抗原産生量をELISA で測定し、発現量の高かったsHM 産生株8-2, 9-3, 14-16 及び14-24 並びにsHM164産生株164-1, 164-5 及び164-8 についても100 nmol/L MTXによる遺伝子増幅を行った (後基B. 項参照)。この時点で最も産生量の高かった164-13はCGM/sHM (尾寄恭子ら 第60回日本血液学会 一般演題 690) の約10倍の抗原産生量を示した。

## 【0078】

B. 100 nmol/L MTXによる遺伝子増幅

sHM 産生株及びsHM164産生株について、10 nmol/L MTX 培地で抗原産生量の高かった各5株ずつ (sHM 産生株8-2, 9-3, 11-4, 14-16 及び14-24 並びにsHM164産生株164-1, 164-2, 164-5, 164-8及び164-13) について、100 nmol/L MTXによる遺伝子増幅を行った。

## 【0079】

10 nmol/L MTX 培地に適応したものから順に細胞数に応じて1/15, 1/10又は1/4量を25 cm<sup>2</sup>フラスコに継代した。10 nmol/L MTX 培地で1日培養後、100 nmol/L MTX培地 ( $\alpha$ -MEM (GIBCO-BRL 社製)、10% FCS (GIBCO-BRL社製)、1% ペニシリン-ストレプトマイシン (GIBCO-BRL 社製)、100 nmol/L MTX (SIGMA 社製)) に交換し、以降100 nmol/L MTX培地で培養を行った。sHM 産生株11-4、並びにsHM164産生株164-2 及び164-13は19日後、sHM 産生株8-2, 9-3, 14-16 及び14-24 並びにsHM164産生株164-1, 164-5及び164-8 は8日後、培養上清 (2日培養) 中の抗原産生量をELISA で測定した。

## 【0080】

さらに産生量の高い、あるいは高くなる可能性のあるsHM 産生株8-2、並びにsHM164産生株164-2 及び164-13について100 nmol/L MTX培地で培養を続け、15日後、培養上清 (3日培養) 中の抗原産生量を再度ELISA で測定した。当初、最も産生量の高かった164-2 株はCGM/sHM (尾嵯恭子ら 第60回日本血液学会 一般演題 690) の5倍以上の抗原産生量を示した。しかし、継代を重ねると最も産生量の高かった164-2 株はCGM/sHM より若干劣る抗原産生量を示し、産生量が下がる傾向が見られた。これより、限界希釈法によりシングルクローン化を行うこととした。

## 【0081】

C. 限界希釈法によるシングルクローン化

sHM 産生株8-2 並びにsHM164産生株164-2 及び164-13について、限界希釈法によるシングルクローン化を行った。

8-2, 164-2及び164-13をそれぞれ100 nmol/L MTX培地で1.7 細胞/mL に調製し

、96ウェルプレート各3枚に150  $\mu$ L/ウェル (0.25細胞/ ウェル) 分注した。13日培養後、コロニーの形成が見られたウェル (8-2 : 13ウェル、164-2 : 36ウェル、164-13 : 23 ウェル) の培養上清 (4日培養) 中の抗原産生量をELISA で測定した。

#### 【0082】

産生量の高かったウェル (8-2 : 6ウェル、164-2 : 15ウェル、164-13 : 9ウェル) から細胞を24ウェルプレートへ継代した。継代用と測定用の2枚のプレートを用意し、測定用のプレートはコンフルエントになった時点で培地交換し、3日培養し、培養上清中の抗原産生量をELISA で測定した。

96ウェル由来164-2 から、最終的にCGM/sHM (尾寄恭子ら 第60回日本血液学会 一般演題 690) で作製したものの約100 倍程度の産生量を示す4株 (164-2-1, 164-2-13, 164-2-17 及び164-2-31) が得られた。

#### 【0083】

##### D. ウエスタンブロット

164-2-1, 164-2-13, 164-2-17 及び164-2-31の細胞株を25 cm<sup>2</sup>フラスコ/ 5mL 培地で1日、3日、及び5日培養した培養上清についてウエスタンブロットを行った。

#### 【0084】

培養上清5  $\mu$ L をPBS (-) で総量 10  $\mu$ L に調製し、それぞれにSDS-サンプル緩衝液 (還元TEFCO 社製) ) を等量加えた。これらを100  $^{\circ}$ Cで5分加熱した後、SDS-PAGE (18 mA、1.5 時間) を行った。但し、ゲルは分離ゲル12.5% とスタックゲル4.5%のミニスラブをLaemi の方法 (Current Protocols in Molecular Biology 10.2.6-10.2.6) に従って作製した。泳動後、ゲルをPVDFメンブレン (ミリポア社製) ) にトランスブロット (10 V、30分) した。そのメンブレンを5% FB S を含むTris緩衝液 (TBS (宝酒造社製) ) 中で25 $^{\circ}$ Cにて1時間振とうして、ブロッッキングを行った。

#### 【0085】

0.05% Tween 20を含むTBS (TBS-T) でゆすいだ後、50  $\mu$ g/mLマウス抗HM1.24抗体 (Blood (1994) 84, 1922-1930) を加え、25 $^{\circ}$ Cで振とうしながら1時間反応

させた。TBS-T を加えて室温で振とうしながら10分間隔で6回緩衝液を交換して、メンブレンを洗浄した。続いて、アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Zymed 社製) を TBS-T にて2000倍希釈したものを二次抗体として同様に25℃で振とうしながら30分間反応させた。

#### 【0086】

反応後、TBS-T を加えて25℃で10分間の振とうを6回繰り返してメンブレンを洗浄した。このメンブレンをBCIP/NBT発色基質 (Promega 社製) を用いて 33  $\mu$ L のニトロブルーテトラゾリウム (NBT) と 16.5  $\mu$ L の5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-ホスフェート (BCIP) を含むウエスタン検出緩衝液 (0.1 mol/L NaCl、5 mmol/L  $MgCl_2$ を含む0.1 mol/L Tris-HCl緩衝液、pH 9.5) に膜を浸して発色させた。

#### 【0087】

バックグラウンドが上がらない程度にdevelop させた後、蒸留水で洗浄しHM1.24抗原を検出した。得られた4クローン (164-2-1, 164-2-13, 164-2-17 及び164-2-31) とともに還元状態で、糖鎖修飾によるヘテロジェネティーと考えられる23-28 kDa のブロードなバンドとして可溶性抗原が検出された。但し、18 kDa、14 kDa付近にHM抗原タンパク質由来のヘテロバンドを認めたため、クロマトを行って、これを除いたものを可溶性抗原とすることとした。

#### 【0088】

##### 参考例 3. 可溶性ヒトHM1.24抗原の精製

可溶性ヒトHM1.24抗原発現CHO 細胞培養上清より、可溶性ヒトHM1.24抗原を精製した。可溶性ヒトHM1.24抗原発現CHO 細胞を培養液 [10% FBS (MOREGATE 社製)、1% ペニシリン-ストレプトマイシン (GIBCO-BRL 社製)、500 nmol/L MTX (Sigma 社製) を含む  $\alpha$ MEM 培地 (GIBCO-BRL 社製)] 中で、37℃、5%  $CO_2$  存在下で培養した。培養上清約 2 Lを遠心により、回収した。

#### 【0089】

ヒト型化抗HM1.24抗体コンジュゲートアフィニティーカラム (約300 mgのヒト型化抗HM1.24抗体をコンジュゲートしたCNBr- 活性化セファロース 4FF) に、培養上清をアプライし、PBS (10XPBS)を10倍希釈したもの：ナカライ) で洗った後

、0.2 mol/L Glycine バッファー (pH 2.48)で溶出した。この画分を、VyDAC C4 カラムを用いた逆相クロマトグラフィーにて、アセトニトリルの濃度勾配で溶出し、粗精製品を得た。

#### 【0090】

さらに、粗精製品を、同様の逆相クロマトグラフィーで、2回のリクロマトグラフィーを行うことによって精製した。この精製品を、PBS で5倍希釈し、Fast Desalting HR10/10カラムを用いて、PBS にバッファー置換を行った。280 nmの吸収から、得られた可溶性ヒトHM1.24抗原の濃度は約0.382 mg/mL と試算され、合計42 mL の精製品が得られた。精製度は、逆相クロマトグラフィーのピーク面積比から、95% 以上の純度であった。

#### 【0091】

##### 【発明の効果】

上記のデータが示すところによれば、多発性骨髄腫患者からのT細胞は、HM1.24を発現する樹状細胞と共に同時インキュベートされた場合、HM1.24を発現する標的細胞に対して抗原特異的態様で応答し、サイトカイン産生及び細胞傷害性応答を惹起する。従って、HM1.24蛋白質又はペプチドは、樹状細胞を基礎とする系において免疫原性であり、そしてT細胞介在応答を誘導することが出来、この応答は抗原特異的であり、そして腫瘍細胞に対して向けられる。

従って、HM1.24蛋白質又はペプチドをパルスした、あるいはHM1.24をコードする遺伝子を導入した樹状細胞、HM1.24蛋白質又はペプチド自体、更にはHM1.24蛋白質又はペプチドをコードするDNA又はRNAは、癌ワクチンとして有用であると期待される。

#### 【0092】

##### 【配列表】

##### SEQUENCE LISTING

<110> Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha

<110> University College London

<120> Cancer Vaccine Using HM 24

<130> 1003378

<160>

<210> 1

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA comprising leader sequence and HA coding sequence

<400> 1

aattcccacc atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt 60  
ccactcatac ccatacgacg tcccagacta cgctgggtacc gcggccgcg 109

<210> 2

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA comprising leader sequence and HA coding sequence

<400> 2

gatccgcggc cgcggtacca gcgtagtctg ggacgtcgta tgggtatgag tggacacctg 60  
tagctgttgc taccaagaag aggatgatac agtccatcc catggtggg 109

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 3

taaaggtacc aacagcgagg cctgccg 27

<210> 4

<211> 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 4

ctgctgcagt gagatcccag gatccata

28

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 396

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homosapiens

<223> Nucleotide sequence of extracellular domain of soluble HM 1.24  
antigenic protein

&lt;400&gt; 1

aac agc gag gcc tgc cgg gac ggc ctt cgg gca gtg atg gag tgt cgc 48

Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys Arg

1 5 10 15

aat gtc acc cat ctc ctg caa caa gag ctg acc gag gcc cag aag ggc 96

Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly

20 25 30

ttt cag gat gtg gag gcc cag gcc gcc acc tgc aac cac act gtg atg 144

Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val Met

35 40 45

gcc cta atg gct tcc ctg gat gca gag aag gcc caa gga caa aag aaa 192

Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys

50 55 60

gtg gag gag ctt gag gga gag atc act aca tta aac cat aag ctt cag 240

Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu Gln

65 70 75 80

gac gcg tct gca gag gtg gag cga ctg aga aga gaa aac cag gtc tta 288

Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu  
 85 90 95  
 agc gtg aga atc gcg gac aag aag tac tac ccc agc tcc cag gac tcc 336  
 Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser  
 100 105 110  
 agc tcc gct gcg gcg ccc cag ctg ctg att gtg ctg ctg ggc ctc agc 384  
 Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser  
 115 120 125  
 gct ctg ctg cag 396  
 Ala Leu Leu Gln

130

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 6

ataggatcct caagcggagc tggagtcctg 30

<210> 7

<211> 345

<212> DNA

<213> Homosapiens

<223> Nucleotide sequence of extracellular domain of C-terminal-lacking  
 soluble HM 1.24 antigenic protein

<400> 1

aac agc gag gcc tgc cgg gac ggc ctt cgg gca gtg atg gag tgt cgc 48  
 Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys Arg

1

5

10

15

aat gtc acc cat ctc ctg caa caa gag ctg acc gag gcc cag aag ggc 96  
Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly  
20 25 30

ttt cag gat gtg gag gcc cag gcc gcc acc tgc aac cac act gtg atg 144  
Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val Met  
35 40 45

gcc cta atg gct tcc ctg gat gca gag aag gcc caa gga caa aag aaa 192  
Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys  
50 55 60

gtg gag gag ctt gag gga gag atc act aca tta aac cat aag ctt cag 240  
Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu Gln  
65 70 75 80

gac gcg tct gca gag gtg gag cga ctg aga aga gaa aac cag gtc tta 288  
Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu  
85 90 95

agc gtg aga atc gcg gac aag aag tac tac ccc agc tcc cag gac tcc 336  
Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser  
100 105 110

agc tcc gct 345  
Ser Ser Ala  
115

<210> 8  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer  
<400> 8

ggatcttggt tcattctcaa gcctcagaca gt 32

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 9

cctcagactc ggcctgaccc gtggaaagaa

30

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 429

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Nucleotide sequence coding for a fusion protein comprising HA  
peptide and soluble HM 1.24 antigenic protein

&lt;400&gt; 10

tac cca tac gac gtc cca gac tac gct ggt acc aac agc gag gcc tgc 48

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Thr Asn Ser Glu Ala Cys

1

5

10

15

cgg gac ggc ctt cgg gca gtg atg gag tgt cgc aat gtc acc cat ctc 96

Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys Arg Asn Val Thr His Leu

20

25

30

ctg caa caa gag ctg acc gag gcc cag aag ggc ttt cag gat gtg gag 144

Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly Phe Gln Asp Val Glu

35

40

45

gcc cag gcc gcc acc tgc aac cac act gtg atg gcc cta atg gct tcc 192

Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val Met Ala Leu Met Ala Ser

50

55

60

ctg gat gca gag aag gcc caa gga caa aag aaa gtg gag gag ctt gag 240

Leu Asp Ala Glu Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys Val Glu Glu Leu Glu  
 65 70 75 80  
 gga gag atc act aca tta aac cat aag ctt cag gac gcg tct gca gag 288  
 Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu Gln Asp Ala Ser Ala Glu  
 85 90 95  
 gtg gag cga ctg aga aga gaa aac cag gtc tta agc gtg aga atc gcg 336  
 Val Glu Arg Leu Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu Ser Val Arg Ile Ala  
 100 105 110  
 gac aag aag tac tac ccc agc tcc cag gac tcc agc tcc gct gcg gcg 384  
 Asp Lys Lys Tyr Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser Ser Ser Ala Ala Ala  
 115 120 125  
 ccc cag ctg ctg att gtg ctg ctg ggc ctc agc gct ctg ctg cag 429  
 Pro Gln Leu Leu Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser Ala Leu Leu Gln  
 130 135 140  
 <210> 11  
 <211> 378  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <223> Nucleotide sequence coding for a fusion protein comprising HA  
 peptide and C-terminal- lacking soluble HM 1.24 antigenic protein  
 <400> 11  
 tac cca tac gac gtc cca gac tac gct ggt acc aac agc gag gcc tgc 48  
 Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Thr Asn Ser Glu Ala Cys  
 1 5 10 15  
 cgg gac ggc ctt cgg gca gtg atg gag tgt cgc aat gtc acc cat ctc 96  
 Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys Arg Asn Val Thr His Leu  
 20 25 30  
 ctg caa caa gag ctg acc gag gcc cag aag ggc ttt cag gat gtg gag 144  
 Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly Phe Gln Asp Val Glu

35	40	45	
gcc cag gcc gcc acc tgc aac cac act gtg atg gcc cta atg gct tcc			192
Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val Met Ala Leu Met Ala Ser			
50	55	60	
ctg gat gca gag aag gcc caa gga caa aag aaa gtg gag gag ctt gag			240
Leu Asp Ala Glu Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys Val Glu Glu Leu Glu			
65	70	75	80
gga gag atc act aca tta aac cat aag ctt cag gac gcg tct gca gag			288
Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu Gln Asp Ala Ser Ala Glu			
85	90	95	
gtg gag cga ctg aga aga gaa aac cag gtc tta agc gtg aga atc gcg			336
Val Glu Arg Leu Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu Ser Val Arg Ile Ala			
100	105	110	
gac aag aag tac tac ccc agc tcc cag gac tcc agc tcc gct			378
Asp Lys Lys Tyr Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser Ser Ser Ala			
115	120	125	
<210> 12			
<211> 379			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Nucleotide sequence coding for L chain V region version a of			
humamized anti-HM 1.24 antibady			
<400> 12			
atg gga tgg agc tgt atc atc ctc tcc ttg gta gca aca gct aca ggt			48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly			
-15	-10	-5	
gtc cac tcc gac atc cag atg acc cag agc cca agc agc ctg agc gcc			96
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala			

-1	1	5	10	
agc	gtg	ggt	gac	aga
gtg	acc	atc	acc	tgt
aag	gct	agt	cag	gat
gtg				144
Ser	Val	Gly	Asp	Arg
Val	Thr	Ile	Thr	Cys
Lys	Ala	Ser	Gln	Asp
Val				
15	20	25		
aat	act	gct	gta	gcc
tgg	tac	cag	cag	aag
cca	gga	aag	gct	cca
aag				192
Asn	Thr	Ala	Val	Ala
Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys
Pro	Gly	Lys	Ala	Pro
Lys				
30	35	40	45	
ctg	ctg	atc	tac	tcg
gca	tcc	aac	cgg	tac
act	ggt	gtg	cca	agc
aga				240
Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser
Ala	Ser	Asn	Arg	Tyr
Thr	Gly	Val	Pro	Ser
Arg				
50	55	60		
ttc	agc	ggt	agc	ggt
acc	gac	ttc	acc	ttc
acc	atc	agc	agc	
				288
Phe	Ser	Gly	Ser	Gly
Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
Thr	Phe	Thr	Ile	Ser
Ser				
65	70	75		
ctc	cag	cca	gag	gac
atc	gct	acc	tac	tac
tgc	cag	caa	cat	tat
agt				336
Leu	Gln	Pro	Glu	Asp
Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr
Cys	Gln	Gln	His	Tyr
Ser				
80	85	90		
act	cca	ttc	acg	ttc
ggc	caa	ggg	acc	aag
gtg	gaa	atc	aaa	c
				379
Thr	Pro	Phe	Thr	Phe
Gly	Gln	Gly	Thr	Lys
Val	Glu	Ile	Lys	
95	100	105		
<210>	13			
<211>	418			
<212>	DNA			
<213>	Artificial Sequence			
<220>				
<223>	Nucleotide sequence coding for H chain V region version r of			
humanized anti-HM 1.24 antibody				
<400>	13			
atg	gac	tgg	acc	tgg
agg	gtc	ttc	ttc	ttg
ctg	gct	gta	gct	cca
ggt				48
Met	Asp	Trp	Thr	Trp
Arg	Val	Phe	Phe	Leu
Leu	Ala	Val	Ala	Pro
Gly				

-15	-10	-5	
gct cac tcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag			96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys			
-1	1	5	10
cct ggg gcc tca gtg aag gtt tcc tgc aag gca tct gga tac acc ttc			144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe			
15	20	25	
act ccc tac tgg atg cag tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt			192
Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu			
30	35	40	45
gag tgg atg gga tct att ttt cct gga gat ggt gat act agg tac agt			240
Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser			
50	55	60	
cag aag ttc aag ggc aga gtc acc atg acc gca gac aag tcc acg agc			288
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser			
65	70	75	
aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg			336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val			
80	85	90	
tat tac tgt gcg aga gga tta cga cga ggg ggg tac tac ttt gac tac			384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr			
95	100	105	
tgg ggg caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca g			418
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
110	115	120	
<210> 14			
<211> 418			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			

&lt;220&gt;

<223> Nucleotide sequence coding for H chain V region version s of  
humanized anti-HM 1.24 antibody

&lt;400&gt; 14

atg gac tgg acc tgg agg gtc ttc ttc ttg ctg gct gta gct cca ggt	48
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly	
-15 -10 -5	
gct cac tcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag	96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
-1 1 5 10	
cct ggg gcc tca gtg aag gtt tcc tgc aag gca tct gga tac acc ttc	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
15 20 25	
act ccc tac tgg atg cag tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt	192
Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gag tgg atg gga tct att ttt cct gga gat ggt gat act agg tac agt	240
Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser	
50 55 60	
cag aag ttc aag ggc aga gtc acc atc acc gca gac aag tcc acg agc	288
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser	
65 70 75	
aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
tat tac tgt gcg aga gga tta cga cga ggg ggg tac tac ttt gac tac	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr	
95 100 105	
tgg ggg caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca g	418

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

110

115

120

<210> 15

<211> 1014

<212> DNA

<213> Homosapiens

<223> Nucleotide sequence coding for humam HM 1.24 antigenic protein  
expressed on cell membrane

<400> 15

gaattcggca cgagggatct gg atg gca tct act tcg tat gac tat tgc 49

Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys

1

5

aga gtg ccc atg gaa gac ggg gat aag cgc tgt aag ctt ctg ctg ggg 97

Arg Val Pro Met Glu Asp Gly Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly

10

15

20

25

ata gga att ctg gtg ctc ctg atc atc gtg att ctg ggg gtg ccc ttg 145

Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu

30

35

40

att atc ttc acc atc aag gcc aac agc gag gcc tgc cgg gac ggc ctt 193

Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ala Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu

45

50

55

cgg gca gtg atg gag tgt cgc aat gtc acc cat ctc ctg caa caa gag 241

Arg Ala Val Met Glu Cys Arg Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu

60

65

70

ctg acc gag gcc cag aag ggc ttt cag gat gtg gag gcc cag gcc gcc 289

Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala

75

80

85

acc tgc aac cac act gtg atg gcc cta atg gct tcc ctg gat gca gag 337

Thr Cys Asn His Thr Val Met Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu

90 95 100 105  
aag gcc caa gga caa aag aaa. gtg gag gag ctt gag gga gag atc act 385  
Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile thr  
110 115 120  
aca tta aac cat aag ctt cag gac gcg tct gca gag gtg gag cga ctg 433  
Thr Leu Asn His Lys Leu Gln Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu  
125 130 135  
aga aga gaa aac cag gtc tta agc gtg aga atc gcg gac aag aag tac 481  
Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr  
140 145 150  
tac ccc agc tcc cag gac tcc agc tcc gct gcg gcg ccc cag ctg ctg 529  
Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu  
155 160 165  
att gtg ctg ctg ggc ctc agc gct ctg ctg cag tgagatccca ggaagctggc 582  
Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser Ala Leu Leu Gln  
170 175 180  
acatcttgga aggtccgtcc tgctcggctt ttcgcttgaa cattcccttg atctcatcag 642  
ttctgagcgg gtcattggggc aacacggtta gcggggagag cacggggtag ccggagaagg 702  
gcctctggag caggtctgga ggggccatgg ggcagtcctg ggtgtgggga cacagtcggg 762  
ttgaccagg gctgtctccc tccagagcct ccctccggac aatgagtcct ccctcttgct 822  
tcccaccctg agattgggca tggggtgcgg tgtggggggc atgtgctgcc tgttgttatg 882  
ggtttttttt gcgggggggg ttgctttttt ctggggtctt tgagctccaa aaaaataaac 942  
acttcctttg agggagagca caccttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaattc 1002  
gggcggccgc ca 1014

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 132

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homosapiens

&lt;223&gt; Amino acid sequence of soluble HM 1.24 antigenic protein

&lt;400&gt; 16

Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys Arg

1 5 10 15

Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly

20 25 30

Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val Met

35 40 45

Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys

50 55 60

Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu Gln

65 70 75 80

Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu

85 90 95

Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser

100 105 110

Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser

115 120 125

Ala Leu Leu Gln

130

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 115

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homosapiens

<223> Amino acid sequence of extra cellular downing of C-terminal  
lacking soluble HM 1.24 antigenic protein

&lt;400&gt; 17

Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys Arg

1 5 10 15

Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly

20 25 30  
 Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val Met  
 35 40 45  
 Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys  
 50 55 60  
 Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu Gln  
 65 70 75 80  
 Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu  
 85 90 95  
 Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser  
 100 105 110  
 Ser Ser Ala

115

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 143

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Amino acid sequence of a fusion protein comprising HA peptide and  
 soluble HM 1.24 antigenic protein

&lt;400&gt; 18

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Thr Asn Ser Glu Ala Cys  
 1 5 10 15  
 Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys Arg Asn Val Thr His Leu  
 20 25 30  
 Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly Phe Gln Asp Val Glu  
 35 40 45  
 Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val Met Ala Leu Met Ala Ser  
 50 55 60

Leu Asp Ala Glu Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys Val Glu Glu Leu Glu  
 65 70 75 80

Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu Gln Asp Ala Ser Ala Glu  
 85 90 95

Val Glu Arg Leu Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu Ser Val Arg Ile Ala  
 100 105 110

Asp Lys Lys Tyr Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser Ser Ser Ala Ala Ala  
 115 120 125

Pro Gln Leu Leu Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser Ala Leu Leu Gln  
 130 135 140

<210> 19

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of a fusion protein comprising HA peptide and  
 C-terminal lacking soluble HM 1.24 antigenic protein

<400> 19

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Thr Asn Ser Glu Ala Cys  
 1 5 10 15

Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys Arg Asn Val Thr His Leu  
 20 25 30

Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly Phe Gln Asp Val Glu  
 35 40 45

Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val Met Ala Leu Met Ala Ser  
 50 55 60

Leu Asp Ala Glu Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys Val Glu Glu Leu Glu  
 65 70 75 80

Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu Gln Asp Ala Ser Ala Glu

85 90 95  
 Val Glu Arg Leu Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu Ser Val Arg Ile Ala  
 100 105 110  
 Asp Lys Lys Tyr Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser Ser Ser Ala  
 115 120 125  
 <210> 20  
 <211> 126  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Amino acid sequence of L chain V region version a of humanized  
 anti-HM 1.24 antibody  
 <400> 20  
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
 -15 -10 -5  
 Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala  
 -1 1 5 10  
 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val  
 15 20 25  
 Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys  
 30 35 40 45  
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg  
 50 55 60  
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser  
 65 70 75  
 Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser  
 80 85 90  
 Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 95 100 105

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 139

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Amino acid sequence of H chain V region version r of humanized  
anti-HM 1.24 antibody

&lt;400&gt; 21

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly

-15 -10 -5

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

-1 1 5 10

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

15 20 25

Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

30 35 40 45

Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser

50 55 60

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser

65 70 75

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

80 85 90

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

95 100 105

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

110 115 120

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 139

&lt;212&gt; PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of H chain V region version s of humanized anti-HM 1.24 antibody

<400> 22

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly

-15

-10

-5

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

-1 1

5

10

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

15

20

25

Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser

50

55

60

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser

65

70

75

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

80

85

90

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

95

100

105

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

110

115

120

<210> 23

<211> 180

<212> PRT

<213> Homosapiens

<223> Amino acid sequence of human HM 1.24 antigenic protein expressed on cell membrane

&lt;400&gt; 23

Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys Arg Val Pro Met Glu Asp Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu  
 20 25 30  
 Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ala  
 35 40 45  
 Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys Arg  
 50 55 60  
 Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly  
 65 70 75 80  
 Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val Met  
 85 90 95  
 Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys  
 100 105 110  
 Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu Gln  
 115 120 125  
 Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu  
 130 135 140  
 Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser  
 145 150 155 160  
 Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser  
 165 170 175  
 Ala Leu Leu Gln  
 180

## 【図面の簡単な説明】

## 【図 1】

図 1 は、HM1.24が負荷された(loaded)末梢血細胞(標的細胞)、自己の腫瘍細胞又はその他の対照細胞と共に、HM1.24をパルスした樹状細胞により刺激され

たT細胞又は未刺激の生来のT細胞がインキュベートされた場合に、それらのT細胞により産生されるインターフェロニン $\gamma$ の量を示すグラフである。

【図 2】

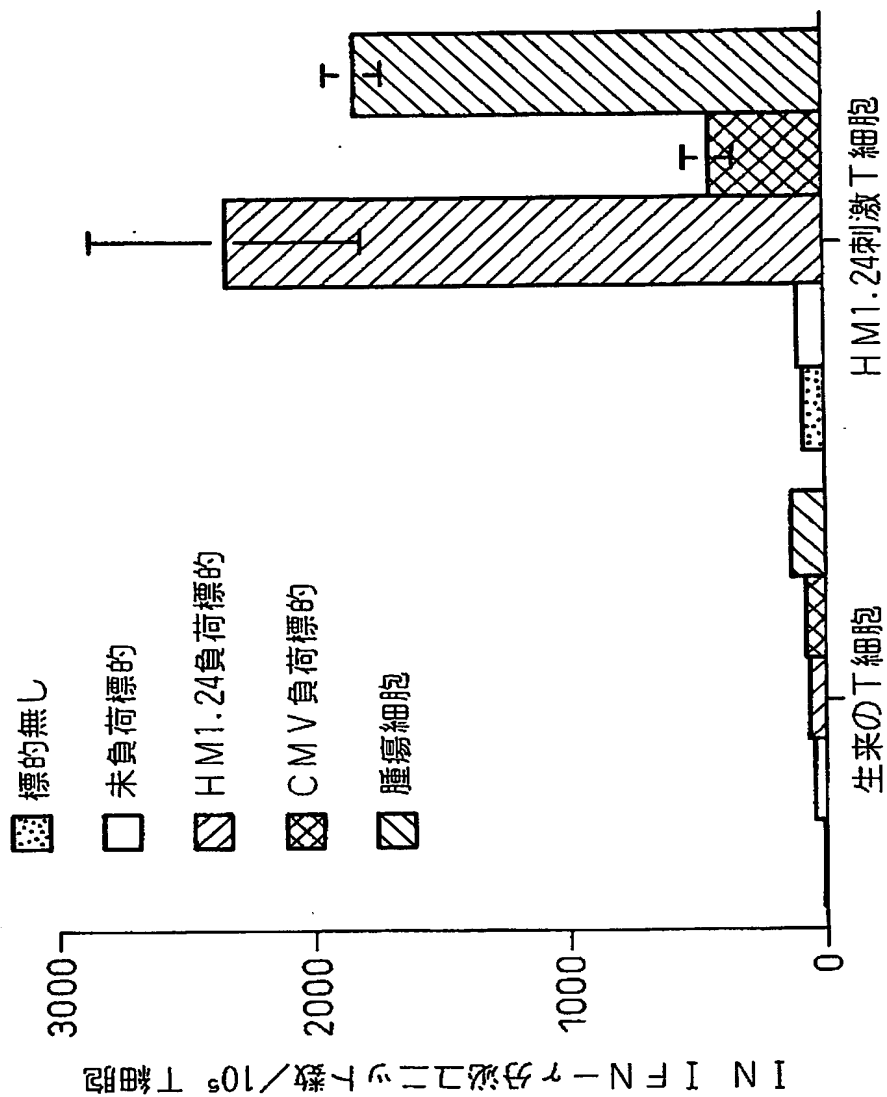
図 2 は、HM1.24をパルスした樹状細胞により刺激されたT細胞（エファクター細胞、細胞傷害性Tリンパ球）が、HM1.24を担持する標的細胞を殺すことを示すグラフである。

【書類名】

図面

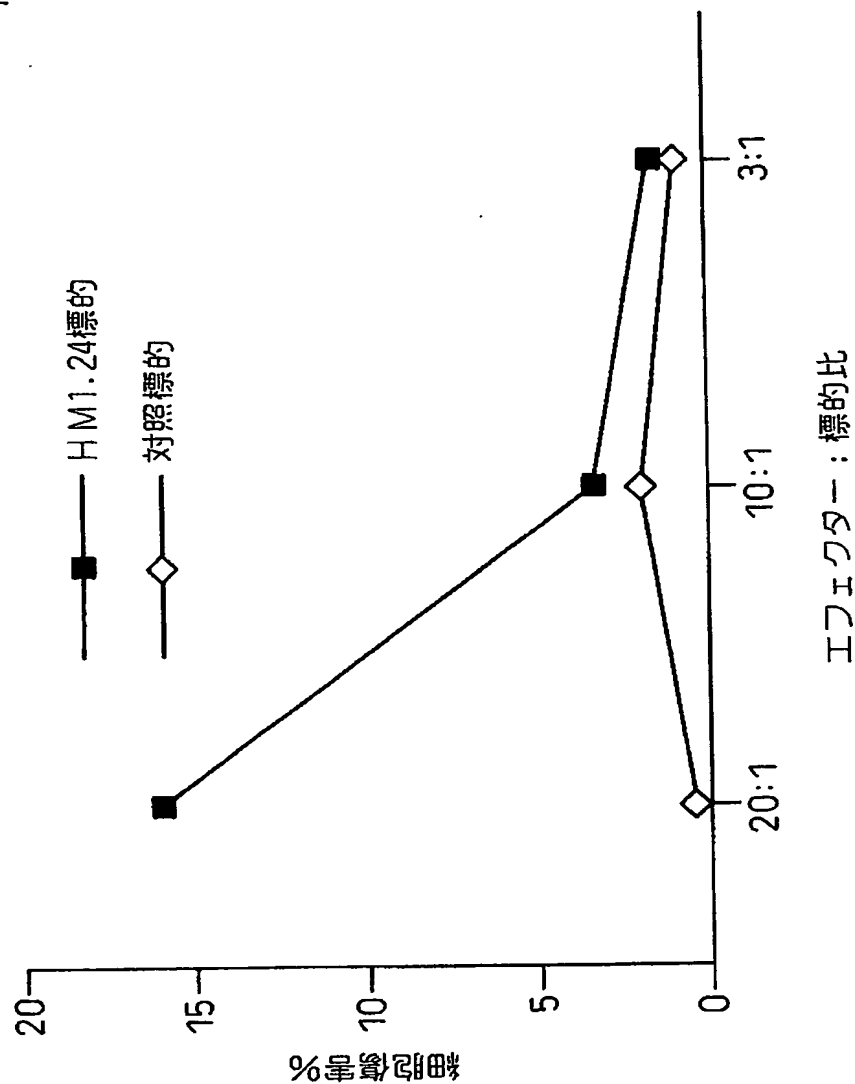
【図 1】

図 1



【図 2】

図 2



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 HM1.24によるT細胞の刺激を含む免疫系に基づく新規な癌ワクチンの提供。

【解決手段】 HM1.24によりパルスされた、あるいはHM1.24をコードする遺伝子が導入された、抗原特異的樹状細胞、HM1.24蛋白質、HM1.24ペプチド、又はHM1.24蛋白質をコードするDNA又はRNAを有効成分とする癌ワクチン。

【選択図】 図1

特願 2002-316639

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[597013168]

1. 変更年月日      1997年   1月29日  
    [変更理由]      新規登録  
        住 所      イギリス国, ダブリュシー1イー 6 ビーティー, ロンドン,  
                    ゴウワー ストリート (番地なし)  
        氏 名      ユニバーシテイ カレッジ ロンドン
  
2. 変更年月日      2001年   3月   9日  
    [変更理由]      住所変更  
        住 所      イギリス国, ロンドン、ガウー、ストリート (番地なし)  
        氏 名      ユニバーシテイ カレッジ ロンドン

特願 2002-316639

出願人履歴情報

識別番号

[000003311]

1. 変更年月日

1990年 9月 5日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都北区浮間5丁目5番1号

氏 名

中外製薬株式会社